

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-342296  
(P2003-342296A)

(43) 公開日 平成15年12月3日 (2003. 12. 3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード <sup>*</sup> (参考)
C 0 7 K 7/08	Z N A	C 0 7 K 7/08	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 13/12	4 H 0 4 j
A 6 1 P 13/12		43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2002-149400 (P2002-149400)

(22) 出願日 平成14年5月23日 (2002. 5. 23)

(71) 出願人 597142387  
黒川 清  
東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401

(71) 出願人 597142376  
宮田 敏男  
神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号

(72) 発明者 黒川 清  
東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401

(74) 代理人 100102978  
弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 メグシン活性阻害因子

(57) 【要約】

【課題】 本発明の課題は、メグシン活性を阻害するポリペプチドとその用途の提供である。

【解決手段】 メグシン活性を阻害するポリペプチドが提供された。さらに、メグシンの活性を阻害するポリペプチドを有効成分として含有する、メサングウム増殖性糸球体腎炎の治療および／または予防のための組成物が提供された。メグシンは、メサングウム増殖性糸球体腎炎を引き起こすことから、メグシン活性を阻害するポリペプチドは、メサングウム増殖性糸球体腎炎の治療または予防に有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 メグシン活性を阻害するポリペプチド。

【請求項2】 配列番号：1に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドによって構成される請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】 請求項1または請求項2に記載のポリペプチドを有効成分とする腎疾患治療および／または予防薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、特定のセルピン（セリンプロテアーゼインヒビター）、すなわちメグシン（Megsin）の反応性ループ領域を構成するポリペプチドおよび該ポリペプチドを用いるメサンギウム増殖性糸球体腎炎の治療、および／または予防のための組成物の治療、および／または予防のための組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】腎不全は、腎疾患患者が最終的に至る病態である。その原因や経歴は様々ではなく、薬物中毒、感染症、悪性腫瘍、糖尿病、全身性エリテマトーデス（SLE）などの本来腎臓以外の病変により、腎障害が発症し、腎不全に至る場合も数多くみられる。

【0003】腎臓の血液濾過作用や解毒作用が全く機能しない末期腎不全においては、腎移植が唯一の治療手段であるが、我が国においては、移植腎の供給体制が十分に整備されているとは言い難い。また、移植療法自体に対する社会的認知も進んでいない。我が国の腎移植例は、年間700余症例に過ぎず、この数値はここ数年増加していない。ゆえに腎代替療法としては透析療法が唯一の治療法であるのが現状である。

【0004】現在、我が国の末期腎不全透析患者は推定約21万人を数え、人口あたりの患者数では世界第一位である。一人当たりの平均的な治療費は年間約600万円を必要とし、医療保険制度を圧迫する大きな原因のひとつとされている。また、毎週2～3日、1日4～6時間を透析治療のために拘束されることから、患者本人の社会復帰も難しい。

【0005】さらに、近年の人口の高齢化に伴い透析患者年齢も上昇しつつある。このため、腎疾患を早期に治療し、腎不全への進展を防ぐ薬剤の必要性が認識されている。しかし、腎疾患領域は、創薬のための標的分子などの情報研究基盤に乏しく、有効な医薬品が誕生しないのが現状である。

【0006】メサンギウム細胞は腎臓以外では見られない臓器特異的な細胞で、腎糸球体の構造や機能保持に重要な役割を担っていることはよく知られている。また糸球体障害時にはメサンギウム細胞自身の増殖やメサンギウム細胞から分泌される細胞外マトリックスの増加などが認められることから、疾患の発症および進展にも深く関与する細胞であると推測されている。これらのことか

ら糸球体障害の分子メカニズムを解明するには、まずメサンギウム細胞の生物学的特性を解明することが不可欠と考えられる。しかし、メサンギウム細胞に関する遺伝子レベルの特異性は明らかにされていなかった。

【0007】ヒトの生体内には約60兆個もの細胞が存在し、これらは同一のゲノムDNAを有しているが、個々の細胞、ひいては臓器が異なった生物学的性質を有するのは各細胞や臓器に特異的に発現する遺伝子によるものと考えられている。本発明者らは、メサンギウム細胞に発現する遺伝子群のプロファイルを明らかにすれば、メサンギウム細胞に特異的な高発現遺伝子群を検出することが可能であると考えた。そして、その中から糸球体腎炎の状態に関与する遺伝子群を決定することもでき、糸球体障害の分子メカニズムを解明する糸口も見つかり、それに基づいた新しい糸球体腎炎の治療法の開発も可能になると考えた。

【0008】そこで、本発明者らは、メサンギウム細胞の遺伝子発現パターンを明らかにし、その細胞特性を遺伝子レベルで解析することを試みた。まず本発明者らは、メサンギウム細胞に発現する遺伝子を定量的に解析することを目的として、培養ヒトメサンギウム細胞からmRNAを抽出して、3'-directed cDNAライブラリーを作製した。そして、クローンに挿入された遺伝子断片の大規模DNA配列決定およびデータベース解析を施行した[Yasuda, Y. et al.: Kidney Int., 53:154-158, 1998]。

【0009】その結果、メサンギウム細胞で特に強く発現する遺伝子として、メグシンと命名した全長2,249bpからなる遺伝子を単離した。そして、メグシンの全長cDNAクローンがコードする380個のアミノ酸からなる新規タンパク質であるメグシタンパク質を単離、取得することに成功した。更に、SwissProtアミノ酸配列データベースを用いてFASTAプログラムによるアミノ酸ホモロジー検索を行った。そして、メグシタンパク質のアミノ酸配列中にセリンプロテアーゼインヒビター（セルピン：SERPIN）スーパーファミリー[Carrell, R.W. et al.: Trends Biochem. Sci., 10:20, 1985; Carrell, R.W. et al.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 52:527, 1987; Kruithof, E.K.O. et al.: Blood, 86, 4007, 1995; Potempa, J. et al.: J. Biol. Chem., 269:15957, 1994; Remold-Donnell, E. FEBS Lett., 315:105, 1993]の生理活性中心部位として重要な反応性ループ領域（reactive loop site）内のコンセンサス配列（EEGTEAAAT／配列番号：2）に類似の配列（EEGTEATAAT／配列番号：3）が存在していることを見出した。すなわち、メグシンは、セルピンの構造的特徴を有し、他のセルピンと同様に活性部位である反応性ループ領域（P17-P5'：EEGTEATAATGSGNIV EKLPQS／配列番号：4）が存在する[Miyata, T. et al.: J. Clin. Invest., 102:828-836, 1998]。これらのことより、ヒトメグシタンパク質が、セルピンに属するタンパク質であることを明らかにした[Miyata, T. et al.: J.

Clin. Invest., 120:828-836, 1998]. そしてこれらの知見を特許出願した (WO 99/15652)。

【0010】セルピンには、アンチトロンビンやプラスミノゲン活性化因子阻害物質 (plasminogen activator inhibitor: PAI)、オブアルブミン等が知られている。これらのセルピン分子は互いに高い相同性を有し、三次元構造も極めてよく似ている。セルピンは、それぞれ対象とするセリンプロテアーゼと複合体を形成し、酵素活性を阻害することが知られている。プロテアーゼの活性部位に結合するのは、セルピンの柔軟な反応性ループ領域 (reactive loop site) である。

【0011】セルピンには活性状態と切断された状態の他に、ポリペプチド鎖は完全だが機能的には不活性で、プロテアーゼに結合しないという伏在的な状態がある。現在では、セルピンのこれら3種類の状態すべてについて、X線結晶解析により構造が決定されている [Huber, R. et al.: Biochem., 28:8951, 1989; Baumann, U. et al.: J. Mol. Biol., 218:595, 1991; Schulze, A. J. et al.: Biochem., 31:7560, 1992; Goldsmith, E. J. et al.: Proteins Struct. Funct. Genet., 9:225, 1991; Goldsmith, E. J. et al.: Nature (London), 355:270, 1992; Schreuder, H. et al.: J. Mol. Biol., 229:249, 1993]。

【0012】セルピン型折りたたみは、部分的に $\alpha$ ヘリックスで覆われた3つの逆平行 $\beta$ シートA、B、Cが作る密な構造からなる。切断されていないオブアルブミンの構造はセルピンの基準形であると考えられ、シートAが5本のストランドを含む。柔軟なループは、 $\beta$ シートAのストランド5の端から始まり、続いて $\alpha$ ヘリックスが分子の外側にあり、さらに $\beta$ シートCの端にあるストランド ( $\beta$ 16) が続き、 $\beta$ シートに含まれるストランド ( $\beta$ 17) の開始点に達する。ループ中央の $\alpha$ ヘリックス領域にセルピンが分断される部位があり、ここは分子の外側にハンドルのように突き出ている。

【0013】活性型アンチトロンビンの柔軟なループ領域は、オブアルブミンと同じく一般的な位置にあるが、ループの始まりに近いいくつかの残基が、 $\beta$ シートAの $\beta$ 5と $\beta$ 15の間に6番目の短い $\beta$ ストランドを形成している。そのうえ、分子の主要部分から出ているループには $\alpha$ ヘリックスがなく、そのままトロンビンの活性部位に挿入できる。すなわち、活性状態のセルピンでは、セリンプロテアーゼの活性部位と結合できるように、ループ領域は、セルピン分子の主要部分から突き出した形となっている (図1(a))。

【0014】 $\alpha$ 1アンチトリプシンの切断型では、ループ領域の始まりから切断部位までの半分は完全な $\beta$ ストランドを形成し、それが $\beta$ シートAのストランド $\beta$ 5と $\beta$ 15の間に差し込まれている。つまり、セルピン分子は、一旦プロテアーゼと非共有結合複合体 (ミカエリス複合体) を形成するが、場合によっては解離する。その時、セルピン分子は、活性部位であるループ領域の突出部で

切断される。切断状態のセルピンでは、ループ領域のN末端部が $\beta$ ストランド5と15の間に入り込み、 $\beta$ シートの中央で長い $\beta$ ストランドを形成している (図1(b))。ループ領域の後半部は活性型アンチトロンビンの場合とほぼ同じ位置を占めている。分断によって生じた2つの新しい末端 (活性型ではつながっていた) はそれぞれ分子の両端にあって、約70Å離れている。

【0015】最後に、PAIの伏在状態では、 $\alpha$ 1アンチトリプシンの切断型と同じく $\beta$ シートAに $\beta$ ストランドが加わっているが、柔軟なループ領域の残り部分は分子の外側でループを構成して $\beta$ シートBの $\beta$ ストランドにつながっており、 $\beta$ シートCの端のストランドはない。この最も安定で活性を持たない伏在状態では、切断された状態と同じくループ領域のN末端部分が $\beta$ シート中に差し込まれた $\beta$ ストランドの形をとる。残りの残基は、 $\beta$ シートの反対側の端でループを形成する (図1(c)) [Carrall, R. W. et al.: Structure, 2:257-270, 1994]。すなわち、セルピンの活性部位であるループ領域は、「活性型」、「切断された状態」、および「伏在状態」の3種類の形態をとり、活性もその形態に依存する [Yamasaki, M. et al.: J. Med. Biol., 315:113-120, 2002; Saunders, D. N. et al.: J. Biol. Chem., 276:43383-43389, 2001]。

【0016】活性型から伏在型への転換が起ると、ループは長い $\beta$ ストランドに変わり $\beta$ シートの中央に挿入される。既に構成されている安定な $\beta$ シートに $\beta$ ストランドを挿入するような大きな構造変化を起こすには、 $\beta$ シート中の隣り合ったストランドがまず離れなければならない。このことは、密な構造をとるために分子内部につくられた多数の疎水的な接触を組み換えるだけでなく、多数の水素結合が切れることを意味している。新たに形成される水素結合や充填のための接触は、余分な $\beta$ ストランドが挿入されてからつくり直さなければならない。 $\beta$ 構造に起こるこのような大きな変化は、セルピンの構造決定以前にはまったく予想もされなかったし、これ以外の系ではまだ観察されていない [Branden, C. et al.: Introduction to Protein Structure Second Edition, 1999]。活性型セルピン分子は、プロテアーゼによってループ内 (P1-P1'部位) が切断され、一旦、非共有結合複合体 (ミカエリス複合体) を形成する (図2A→図2B)。その後、ループ領域のN末端が $\beta$ シートAの間に入り込み、複合体は共有結合となり、プロテアーゼは不活性化される (図2C)。しかし場合によって非共有複合体は解離し、セルピン分子は切断された状態 (不活性型 (図1B))、プロテアーゼはセルピンによる影響を受けず活性型を維持する。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療等に有効なメグシン活性の阻害因子を提供することである。また、本発明は、メグシンの反応性ループ領域を構成するポリペプチ

ドおよび該ポリペプチドを用いるメサンギウム増殖性糸球体腎炎の治療、および／または予防のための組成物の治療、および／または予防のための組成物に関する。

#### 【0018】

【課題を解決するための手段】メグシンは、セリンプロテアーゼインヒビター (SERPIN) の構造的特徴を有し、他のセルピンと同様に活性部位である反応性ループ領域 (P17-P5' : EEGTEATAATGSNIVEKQLPQS / 配列番号 : 4) が存在する [Miyata, T. et al. : J. Clin. Invest., 102:828, 1998]。一方、メグシンのトランスジェニックマウスが進行性のメサンギウム基質の拡大、糸球体内の細胞の増加、および免疫複合体沈着物の増加を示すことから、そのセルピン活性により腎炎が惹起されている可能性が強く示唆される [Miyata, T. et al. : J. Clin. Invest., 109, 585, 2002]。

【0019】メグシンがセルピンスーパーファミリーに属する糸球体高発現遺伝子であることから、この遺伝子が糸球体における機能遺伝子で、糸球体腎炎の発症／進展に関連性を有すると考えられる。そしてメグシントタンパク質がセルピンスーパーファミリーの中でもプロテアーゼ活性阻害能を有する亜群に特有の reactive loops ite 構造を有することから、ある種のセリンプロテアーゼに対する抑制因子として働くことが考えられる。

【0020】プロテアーゼ活性はプロテアーゼとそれに対する抑制因子間の活性のバランスによって一定に保たれており、その変動は組織／細胞の機能や病態に著しく影響を及ぼすことが知られている。事実、糸球体硬化時には、細胞外マトリックス蛋白のプロテアーゼによる分解能低下がみられる。また別の例として、セルピンの一種である PAI-1 (メグシントタンパク質とのアミノ酸相同性は 27.7%) の高発現マウスでは野生マウスに比し、ブレオマイシン反応性線維症が高率に誘発されるが、逆に PAI-1 欠損マウスでは線維症が起りにくいという研究結果も報告されている [Eitsman, D. T. et al. : J. Clin. Invest., 97:232, 1996]。

【0021】さらに近年、セルピンはセリンプロテアーゼ活性を抑制するのみならず、血液凝固、線維素溶解、炎症反応、細胞分化／増殖、アポトーシスにも関与し、その生理機構や病態生理学的意義が多岐にわたることが報告されている [Kruithof, E. K. O. et al. : Blood, 86, 1:4007, 1995 ; Bachmann, F. Thromb. Haemostasis, 74:172, 1995 ; Tsujimoto, M. et al. : J. Biol. Chem., 272:15373, 1997 ; Bird, P. I. Results Probl. Cell. Differ., 24:63, 1998 ; Potempa, J. et al. : J. Biol. Chem., 269:15957, 1994]。

【0022】更に、様々な組織および細胞をノーザンブロットおよび逆転写ポリメラーゼ連鎖反応で分析したところ、メグシンは、ヒト繊維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、ケラチノサイトでは発現が弱く、メサンギウム細胞で特に強く発現していることが判った。即ち、メグシ

ン遺伝子の発現はメサンギウム細胞に特異性を有する。これらの知見はさらに in situ ハイブリダイゼーション [Miyata, T. et al. : J. Clin. Invest., 102:828, 1998 ; Suzuki, D. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 10:2606, 1999] およびメグシン抗体を用いた免疫組織化学法 [Inagi, R. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 286:1098, 2001] により確認された。

【0023】また、IgA 腎症患者や糖尿病性腎症患者と健常人とで腎臓組織中のメグシンの発現量を比較すると、IgA 腎症患者や糖尿病性腎症患者においてメグシンの発現量が有意に多い [Miyata, T. et al. : J. Clin. Invest., 102:828, 1998 ; Suzuki, D. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 10:2606, 1999 ; Inagi, R. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 286:1098-1106, 2001]。また、ラットを用いた実験的メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデル (Thy-1 腎炎モデル) において、同様なメグシン発現量の上昇が認められた [Nangaku, M. et al. : Kidney Int., 60:641, 2001]。このことからメグシンの発現がメサンギウム細胞の機能異常に伴い変化し、疾患の発症／進展に深く関与していることが明らかになった。

【0024】メサンギウムの機能におけるメグシンの役割をさらに理解するために、我々はマウスゲノムでヒトメグシンの cDNA を過剰発現させた。2 系統のメグシントランスジェニックマウスが得られ、それらは、進行性のメサンギウム基質の拡大、メサンギウム細胞の増殖、および免疫複合体沈着物の増加を示した [Miyata, T. et al. : J. Clin. Invest., 109, 585, 2002, WO 01/24628]。これらの知見は、メグシンが、メサンギウムの機能に生物学的に重要な影響を及ぼすことを示している。興味深いことに、メグシンの単一遺伝子操作は、実験的およびヒト糸球体腎炎に存在する初期的なメサンギウム病変を発生させることができる。このように、動物個体においても、メグシンはメサンギウム増殖性糸球体腎炎の発症に関与することが報告されている。

【0025】従って、メグシンに対し、その活性を阻害し得る活性を有する物質、とりわけ特異性に優れたポリペプチド類を見出し、特定することは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

【0026】本発明者らは、組換えメグシンのプラスミン活性阻害能を指標に、メグシン活性に対し阻害作用を有するポリペプチドを探索した結果、メグシンの反応性ループ領域内の P1-P14 配列に相当する TEATAATGSNIVEK (配列番号 : 1) からなる特定の配列を有するポリペプチドが、メグシン活性を阻害しうることを見出し、本発明を完成した。メグシンの反応性ループ領域 (P17-P5' : EEGTEATAATGSNIVEKQLPQS / 配列番号 : 4) の配列は知られていたが、反応性ループ領域内の特定部位のポリペプチドがメグシン活性を阻害するとの知見は確認され

ていなかった。本発明によるポリペプチドは、メグシンとメグシンに対するセリンプロテアーゼであるプラスミンとの反応を阻害することができる。すなわち、本発明は以下のポリペプチド、ならびにその用途に関する。

〔１〕メグシン活性を阻害するポリペプチド。

〔２〕配列番号：１に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドによって構成される〔１〕に記載のポリペプチド。

〔３〕〔１〕または〔２〕に記載のポリペプチドを有効成分とする腎疾患治療および／または予防薬。

【００２７】

【発明の実施の形態】本発明は、メグシンの活性を阻害するポリペプチドを提供する。本発明において、メグシンの活性の阻害とは、メグシンのセルピン活性が低下することを意味する。またセルピン活性とは、セリンプロテアーゼのプロテアーゼ活性に対する阻害作用である。本発明において、阻害とは、セルピン活性の完全な抑制のみならず、部分的な抑制を含む。

【００２８】ポリペプチドがメグシンの活性を阻害することは、たとえば実施例２に記載の方法によって確認することができる。すなわち、メグシンに対するセリンプロテアーゼとしてプラスミンを用い、メグシンのプロテアーゼ活性阻害能に対する、ポリペプチドの抑制効果を指標として、その阻害活性を確認することができる。プロテアーゼ活性は、たとえば蛍光基質の消化を観察することにより測定することができる。

【００２９】本発明者らは、メグシンの反応性ループ領域を構成するポリペプチドが、メグシン活性の阻害作用を有することを見出した。メグシンの反応性ループ領域を構成するポリペプチドとは、メグシンのアミノ酸配列中、特に配列番号：１に記載のアミノ酸配列からなる領域を言う。したがって本発明のポリペプチドは、配列番号：１に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

【００３０】本発明によるポリペプチドは、配列番号：１に記載のアミノ酸からなるポリペプチドを有効成分として含有する。本発明のポリペプチドは、化学的合成法などの定法により得ることができる。また、本発明のポリペプチドを含有するメサングウム細胞増殖性腎症を治療および／または予防するための医薬組成物は、そのままあるいは水に希釈する等の各種処理を施して使用することができる。この場合の配合量は病態や製品に応じて適宜選択されるが、通常全身投与製剤の場合には、０．００１～５０重量％、特に０．０１～１０重量％とすることができ、０．００１重量％より少ないと満足する予防または治療作用が認められない可能性があり、また、５重量％を越えると製品そのものの安定性や香味等の特性が損なわれる可能性があるので好ましくない。

【００３１】本発明のポリペプチドは、製剤学的に許容

される塩として製剤中に含有されていてもよい。薬剤学的に許容される塩としては、例えば無機塩基、有機塩基等の塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩等が挙げられる。無機塩基としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム、アンモニウム等が挙げられる。有機塩基としては、例えば、エタノールアミン等の第一級アミン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、 $N,N'$ -ジベンジルエチレンジアミン等の第二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、トリエタノールアミン等の第三級アミン等が挙げられる。無機酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等が挙げられる。有機酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、 $p$ -トルエンスルホン酸等が挙げられる。塩基性アミノ酸としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチン等が挙げられる。酸性アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

【００３２】本発明の医薬組成物の投与方法として、経口投与、静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与等が適宜選択でき、その投与方法に応じて、種々の製剤として用いることができる。以下に、各製剤について記載するが、本発明において用いられる剤型はこれらに限定されるものではなく、医薬製剤分野において通常用いられる各種製剤として用いることができる。

【００３３】＜全身投与製剤＞メサングウム増殖性糸球体腎炎に対する治療および／または予防のために用いる場合には、ポリペプチドの経口投与量は、０．００３ｍｇ／ｋｇ～３ｍｇ／ｋｇの範囲が好ましく、より好ましくは０．０３ｍｇ／ｋｇ～０．３ｍｇ／ｋｇである。全身投与を行う場合、特に静脈内投与の場合には老若男女または体型等により変動があるが、有効血中濃度が０．２μｇ／ｍＬ～２０μｇ／ｍＬ、より好ましくは０．５μｇ／ｍＬ～１０μｇ／ｍＬの範囲となるように投与すべきである。

【００３４】経口投与を行う場合の剤型として、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤およびシロップ剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。また、口腔内局所投与を行う場合の剤型として、咀嚼剤、舌下剤、バツカル剤、トローチ剤、軟膏剤、貼布剤、液剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。

【0035】上記の各剤型について、公知のドラッグデリバリーシステム（DDS）の技術を採用することができる。本明細書に言うDDS製剤とは、徐放化製剤、局所適用製剤（トローチ、パッカ錠、舌下錠等）、薬物放出制御製剤、腸溶性製剤および胃溶性製剤等、投与経路、バイオアベイラビリティ、副作用等を勘案した上で、最適の製剤形態にした製剤を言う。

【0036】DDSの構成要素には基本的に薬物、薬物放出モジュール、被包体および治療プログラムから成り、各々の構成要素について、特に放出を停止させた時に速やかに血中濃度が低下する半減期の短い薬物が好ましく、投与部位の生体組織と反応しない被包体が好ましく、さらに、設定された期間において最良の薬物濃度を維持する治療プログラムを有するのが好ましい。薬物放出モジュールは基本的に薬物貯蔵庫、放出制御部、エネルギー源および放出孔または放出表面を有している。これら基本的構成要素は全て揃っている必要はなく、適宜追加あるいは削除等を行い、最良の形態を選択することができる。

【0037】DDSに使用できる材料としては、高分子、シクロデキストリン誘導体、レシチン等がある。高分子には不溶性高分子（シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、エチルセルロース、セルロースアセテート等）、水溶性高分子およびヒドロキシルゲル形成高分子（ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート架橋体、ポリアクリル架橋体、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、水溶性セルロース誘導体、架橋ポロキサマー、キチン、キトサン等）、徐溶解性高分子（エチルセルロース、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステル等）、胃溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースナトリウム、マクロゴール、ポリビニルピロリドン、メタアクリル酸ジメチルアミノエチル・メタアクリル酸メチルコポリマー等）、腸溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸フタルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、アクリル酸系ポリマー等）、生分解性高分子（熱凝固または架橋アルブミン、架橋ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、ポリシアノアクリレート、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリβヒドロキシ酢酸、ポリカプロラクトン等）があり、剤型によって適宜選択することができる。

【0038】特に、シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルは薬物の放出制御に使用でき、セルロースアセテートは浸透圧ポンプの材料として使用でき、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシ

プロピルセルロース、メチルセルロースは徐放性製剤の膜素材として使用でき、ポリアクリル架橋体は口腔粘膜あるいは眼粘膜付着剤として使用できる。

【0039】また、製剤中にはその剤形（経口投与剤、注射剤、座剤等の公知の剤形）に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤等の添加剤を加えて製造することができる。

【0040】これら各添加剤について、それぞれ具体例を挙げて例示するが、これらに特に限定されるものではない。溶剤としては、精製水、注射用水、生理食塩液、ラッカセイ油、エタノール、グリセリン等を挙げることができる。賦形剤としては、デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトール等を挙げることができる。コーティング剤としては、白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロースおよび上記記載した高分子等を挙げることができる。基剤としては、ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤等を挙げることができる。結合剤としては、デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴム等の天然高分子化合物、ポリビニルピロリドン等の合成高分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチ等を挙げることができる。滑沢剤としては、ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、小麦デンプン、マクロゴール、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。崩壊剤としては、デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架橋体、低置換型ヒドロキシプロピルセルロース等を挙げることができる。溶解補助剤としては、シクロデキストリン、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。懸濁化剤としては、アラビアゴム、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、クエン酸、各種界面活性剤等を挙げることができる。粘稠剤としては、カルメロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム等を挙げることができる。乳化剤としては、アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチルセルロース、各種界面活性剤、レシチン等を挙げることができる。安定剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性物質等を挙げることができる。緩衝剤としては、

リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸等を挙げることができる。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖等を挙げることができる。無痛化剤としては、塩酸プロカイン、リドカイン、ベンジルアルコール等を挙げることができる。保存剤としては、安息香酸およびその塩類、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、逆性石けん、ベンジルアルコール、フェノール、チロメサル等を挙げることができる。矯味剤としては、白糖、サッカリン、カンゾウエキス、ソルビトール、キシリトール、グリセリン等を挙げることができる。芳香剤としては、トウヒチンキ、ローズ油等を挙げることができる。着色剤としては、水溶性食用色素、レーキ色素等を挙げることができる。

【0041】上記したように、医薬品を徐放化製剤、腸溶性製剤または薬物放出制御製剤等のDDS製剤化することにより、薬物の有効血中濃度の持続化、バイオアベイラビリティの向上等の効果が期待できる。しかし、ポリペプチドは生体内で失活化または分解され、その結果、所望の効果が低下または消失する可能性がある。従って、ポリペプチドを失活化または分解する物質を阻害する物質をメサンギウム細胞増殖性腎症の治療および／または予防のための医薬組成物と併用することにより、成分の効果をさらに持続化させ得る。これらは製剤中に配合してもよく、または別々に投与してもよい。当業者は適切に、ポリペプチドを失活化または分解する物質を同定し、これを阻害する物質を選択し、配合あるいは併用することができる。

【0042】製剤中には、上記以外の添加物として通常の組成物に使用されている成分を用いることができ、これらの成分の添加量は、本発明の効果を妨げない範囲で通常量とすることができる。

#### 【0043】

【実施例】〔実施例1〕公知の方法 [Inagi, R. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 286:1098-1106, 2001] に準じ、ヒトのメグシンcDNAをトランスフェクトしたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞の培養上清から組換えヒトメグシンを得た。培養上清2Lに100mLの1M酢酸ナトリウムを加えてpH4.5に調整した後、50mM酢酸ナトリウムを加え、2倍に希釈した。希釈液をイオン交換クロマトグラフィー (HiPrep 16/10 SP XL: アマシャム・バイオサイエンス製) に供した (溶出条件: 50mM酢酸ナトリウム (pH4.5)、NaCl 0~1Mリニアグラジエント; 溶出容積: 20×カラムベッドボリューム)。溶出液をゲル濾過によりバッファー交換を行い (HiPrep 26/10 Desalting, 20mMリン酸カリウム (pH6.8))、続いてハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー (HT-1: Bio-Rad製) に供した (溶出条件: 20mMリン酸カリウム (pH6.8)、リン酸カリウム20~400mMリニアグラジエント; 溶出容積: 30×カラムベッドボリューム)。溶出液を再度ゲル濾過によりバッファー交換を行い (HiPrep 26/10 D

esalting, 50mM MES (pH5.5)、50mM NaCl)、イオン交換クロマトグラフィー (Mono S HR 5/5: アマシャム・バイオサイエンス製) に供した (溶出条件: 50mM MES (pH5.5)、50mM NaCl、NaCl 50~100mMリニアグラジエント; 溶出容積: 40×カラムベッドボリューム)。溶出液をCentricon10 (ミリポア製) を用いて遠心濃縮し (3,000g)、ダルベッコPBS(-)緩衝液 (日本製薬製) にバッファー交換した。遠心濃縮とバッファー交換を3回繰り返して、精製組換えメグシンを得た。クロマトグラフィー装置は、AKTAexplorer 10s (アマシャム・バイオサイエンス製) を用い、操作は全て4℃で行った。

#### 【0044】〔実施例2〕MCAアッセイ

定法によりメグシンのP1-P14配列に相当するポリペプチド (TEATAATGSNIVEK) を合成した。この14個のアミノ酸からなるポリペプチドと上記実施例1で得られた精製メグシンを0.1M Tris (pH8.0) および0.05%のTween20中、種々のモル比で37℃にて30分間インキュベーションした。続いて、メグシンに対するセリンプロテアーゼであるプラスミンと37℃で30分間反応させた後、0.5mMの合成蛍光プラスミン基質、Boc (t-butylloxycarbonyl)-Glu-Lys-Lys-MCA (4-methyl-coumaryl-7-amid) (ペプチド研究所) と反応させ、 $\lambda_{ex}=380nm$  および  $\lambda_{em}=460nm$  において、ペプチド-MCAからAMCへの切断の蛍光測定を行った。対照として無作為に配列させた14個のアミノ酸からなるポリペプチドを用いた。結果を図3に示す。プラスミンの蛍光強度を○で示す。プラスミンにメグシンのみを添加した場合では、プラスミン活性がメグシンにより阻害され、プラスミン基質の蛍光強度が低下する

(●)。さらに、プラスミンにメグシンおよび本発明のポリペプチドを添加したときには、本発明のポリペプチドはメグシンのプラスミンに対する阻害活性を濃度依存的に阻害し、その結果プラスミン基質の蛍光強度が保持された (900倍: △、450倍: ▲)。一方、対照のポリペプチドにおいては阻害効果を認めなかった (900倍: □)。

#### 【0045】

【発明の効果】本発明により、メグシン活性を阻害するポリペプチドが提供された。また本発明により、メグシンの反応性ループ領域を構成するポリペプチドが、メグシン活性を阻害し得ることが確認された。メグシンは、糸球体において、メサンギウム基質の拡大、糸球体内の細胞の増加、免疫複合体の沈着の原因となる分子である。これらの病変は、ヒトのメサンギウム増殖性糸球体腎炎に特徴的な病理像である。メサンギウム基質の拡大は、メサンギウム増殖性の腎炎をはじめとする多くの腎臓障害において重要な病変である。したがって、メグシンの活性を阻害するポリペプチドは、メサンギウム基質の拡大を伴う疾患の治療において有用である。

【0046】また本発明は、メグシンの活性を阻害するポリペプチドを有効成分として含有する、メサンギウム

増殖性糸球体腎炎の治療および／または予防のための組成物を提供する。既に述べたように、メグシンは、メサンギウム増殖性糸球体腎炎を引き起こす。したがって、メグシン活性を阻害するポリペプチドは、メサンギウム

増殖性糸球体腎炎の治療または予防に有用である。

【0047】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> Kurokawa, Kiyoshi  
Miyata, Toshio  
<120> Megsin activity inhibition factor  
<130> KRK-A0207  
<140>  
<141>

<160> 4  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:peptide  
sequence  
<400> 1  
Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys  
1 5 10  
<210> 2  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:consensus  
sequence  
<400> 2  
Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr  
1 5 10  
<210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:peptide  
sequence  
<400> 3  
Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr  
1 5 10  
<210> 4  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:peptide



sequence  
<400> 4  
Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu  
1 5 10 15  
Lys Gln Leu Pro Gln Ser  
20

【図面の簡単な説明】

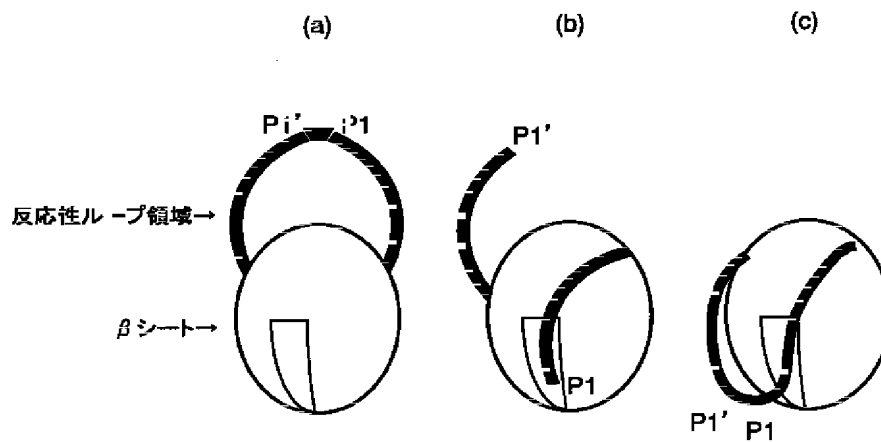
【図1】 セルピンの活性部位である反応性ループ領域の、3種類の状態における構造の違いを示す模式図。

(a)：活性型、(b)：切断された状態、(c)：伏在状態を表す。

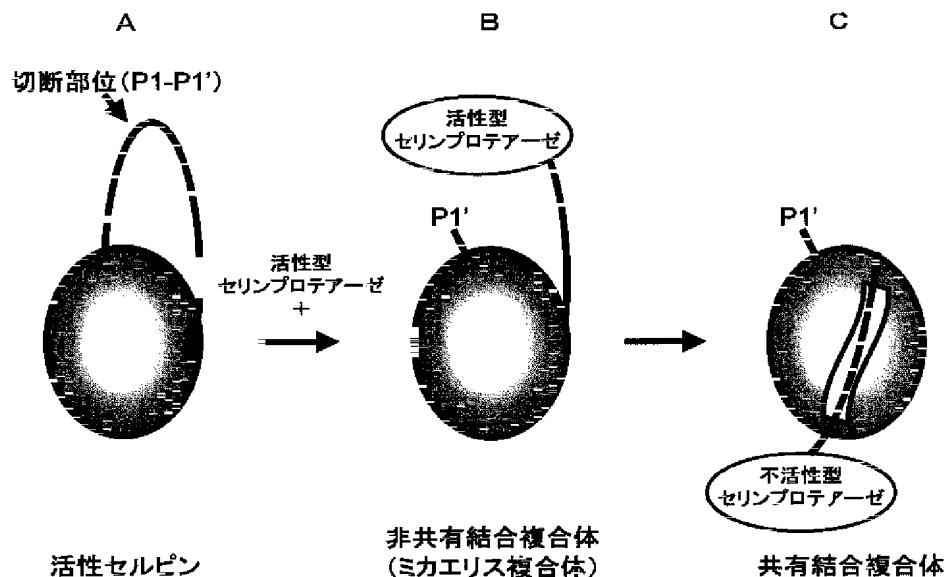
【図2】 セルピンのプロテアーゼ阻害機序を示す図。

【図3】 本発明のポリペプチドによるMCAアッセイの結果を示す図。○：プラスミン、●：プラスミン+メグシン、△：プラスミン+メグシン+ポリペプチド（900倍）、▲：プラスミン+メグシン+ポリペプチド（450倍）、□：プラスミン+メグシン+対照ポリペプチド（900倍）

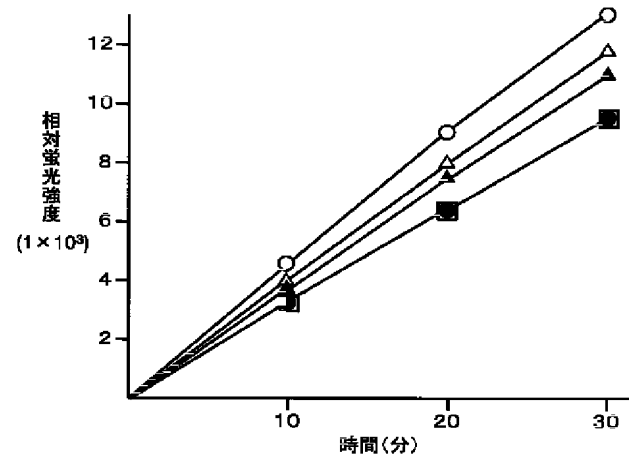
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 宮田 敏男

神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エク

セル伊勢原102号

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 AA07 BA01 BA08

BA18 CA59 DC50 MA22 MA23

MA35 MA37 MA41 MA43 MA52

MA55 MA56 MA57 MA60 MA63

MA66 NA14 ZA812 ZC192

ZC412

4H045 AA10 AA30 BA16 CA40 EA26